

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): FARWICK et al.

Appln. No.:	09	825,293
Series Code	↑	↑ Serial No.

Group Art Unit: To Be Assigned

Filed: April 4, 2001

Examiner: To Be Assigned

Title: Novel Nucleotide Sequences Encoding the m1E-17 Gene

Atty. Dkt.	P 280108	000561 BT
	M#	Client Ref

Date: July 23, 2001

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
100 47 867.0	GERMANY	September 27, 2000

Respectfully submitted,

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Tel: (202) 861-3000
Atty/Sec: MAS/AMX

By Atty:	<u>Michael A. Sanzo</u>	Reg. No.	<u>36912</u>
Sig:	<u><i>Michael A. Sanzo</i></u>	Fax:	(202) 822-0944
		Tel:	(202) 861-3020



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 47 867.0

Anmeldetag: 27. September 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleo-
tidsequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 8. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das mikE17-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen
Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist/sind L-Lysin.

- 20 Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
5 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
10 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
15 innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

20 Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1
dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
25 kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen
Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende
Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen
- 10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise
- 15 Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator MikE17 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des mikE17-Gens aufweisen.

- 20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Transkriptionsregulator MikE17 kodieren.

- 25 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

- 30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus
- 5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.
- 10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.
- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
- 15 biologischen Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.
- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,
- 25 L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das mikE17-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.
- 30 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder
5 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder
10 aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist,
15 L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
20 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
25 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme.

Das neue, für den Transkriptionsregulator MikE17
30 kodierende mikE17-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des mikE17-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das

- Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
- 5 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- 10 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- 15 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
- 20 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.
- 30

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das miki17-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des miki17-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,

Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

5 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur

10 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

15 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des mikE17-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des mikE17-Gens oder die regulatorischen

25 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)

30 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in

der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in

deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung
5 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und
10 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology
15 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen
20 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder
25 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,
30 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den
35 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das mikE17-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des mikE17-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen

Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

- 5 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der Abschwächung des mikE17-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- 10
 - das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
 - das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15
 - das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
 - das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),
 - das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609),
- 20
 - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo* (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 25
 - das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (Accession No.P26512),
 - das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
 - das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A 0131171),

das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al.,
5 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental
10 Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren
15 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *mikE17*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE:
25 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des mikE17-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: 5 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 10 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 15 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

20 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 25 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, 30 Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,
5 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder
10 die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren
15 und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der
20 Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise
25 eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um
30 aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis
35 sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.

Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung

Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

- 5 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
- 10 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
- 15 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 20 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 25 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
- 30 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens mikE17

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, 5 Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem 10 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter 15 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 20 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, 25 Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1425 bp, welches als mikE17-Gen bezeichnet wurde. Das mikE17-Gen kodiert für ein Polypeptid 30 von 474 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> aaaaae BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1890

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(1673)

25 <223> mikE17-Gen

<400> 1

aaccctgttt ggtatcaacc aaaaagtta gacagcccaa ccttccgatc cagggagcaa 60

30 ctttgccgag gtgacacaat tatcccaaca gttgcaccgt aggtgcctaa aaagttcccg 120

gggcggatgt ggcccgacca cgccgggcac ctggtggcgg cgggctgcgt cgaaaagcga 180

aaatcaacaa gtttgcaaca cctcagtgcc aagagtgggt aaggtgatgg tgatcacgct 240

35 atagttgcgc c atg gga aag aca tat gtg ggg tcc agg ctg cgc caa ctg 290

Met Gly Lys Thr Tyr Val Gly Ser Arg Leu Arg Gln Leu
1 5 10

40 cgc cgc gaa aga gac ctg agc cag gca tcc tta gca gca acc ctt ggc 338

Arg Arg Glu Arg Asp Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ala Ala Thr Leu Gly
15 20 25

tta tct gca agt tat gta aat cag att gag cac gac gta cgc ccg ctc 386

45 Leu Ser Ala Ser Tyr Val Asn Gln Ile Glu His Asp Val Arg Pro Leu
30 35 40 45

acc gta ccg gtg tta ttg cgc atc acc gag gcg ttc ggc gta gac gca 434

Thr Val Pro Val Leu Leu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Gly Val Asp Ala
50 55 60

50 acg ttt ttc tcc cgc gac gat gac tcc cgc ctg ctc gcc gag gtc caa 482

Thr Phe Phe Ser Arg Asp Asp Asp Ser Arg Leu Leu Ala Glu Val Gln
65 70 75

55 gac gtc atg ctg gac cgg gag atc aat cct gcg aac gtg gag ctg caa 530

Asp Val Met Leu Asp Arg Glu Ile Asn Pro Ala Asn Val Glu Leu Gln
80 85 90

gag ctt tcg gag atg gtg tac aac cac ccc caa cta gcg cgc gcg atg 578

	Glu	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Tyr	Asn	His	Pro	Gln	Leu	Ala	Arg	Ala	Met	
	95						100					105					
5	gtg	gaa	atg	cac	cag	cgt	tac	cga	aac	gtg	cgc	gat	aag	ttc	tcc	atc	626
	Val	Glu	Met	His	Gln	Arg	Tyr	Arg	Asn	Val	Arg	Asp	Lys	Phe	Ser	Ile	
	110					115					120					125	
10	gca	gtg	gat	aat	cgc	acc	aac	acg	cct	gag	gaa	cgc	cgt	ccc	atc	gcg	674
	Ala	Val	Asp	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Arg	Pro	Ile	Ala	
					130					135					140		
15	gag	gcc	gtg	agc	atg	ccg	cac	gaa	gag	gtc	cgc	gat	ttc	att	tac	gcc	722
	Glu	Ala	Val	Ser	Met	Pro	His	Glu	Glu	Val	Arg	Asp	Phe	Ile	Tyr	Ala	
				145				150						155			
20	cgc	caa	aac	tac	ttc	gat	gcc	ctt	gac	cgc	cgc	gcc	gaa	gcc	atc	gcc	770
	Arg	Gln	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	
			160					165					170				
25	gcg	caa	ctg	ggc	tgg	cag	ccg	tac	gat	tcc	cgc	gcc	atg	gaa	gat	tcg	818
	Ala	Gln	Leu	Gly	Trp	Gln	Pro	Tyr	Asp	Ser	Arg	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	
			175				180					185					
30	atc	gcc	cgc	cgc	ctg	caa	atg	gat	cac	gat	gtc	acc	atc	acc	tcc	tcc	866
	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Gln	Met	Asp	His	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Ser	Ser	
						195					200					205	
35	aaa	gag	gaa	tcc	ggc	acg	ctg	cac	cac	ttc	gac	ccc	gag	acg	cgt	ctg	914
	Lys	Glu	Glu	Ser	Gly	Thr	Leu	His	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Leu	
					210					215					220		
40	ctg	aca	atc	cac	gca	cgc	ctc	aac	ccc	ggg	caa	cgc	gcc	ttc	cgc	atg	962
	Leu	Thr	Ile	His	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Gly	Gln	Arg	Ala	Phe	Arg	Met	
				225				230						235			
45	gcc	acc	gaa	ctc	ggc	tac	cta	gaa	gcc	aac	gac	ctc	atc	gaa	ggg	atc	1010
	Ala	Thr	Glu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Ala	Asn	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ile	
				240				245					250				
50	gtt	gac	gac	ggc	atc	tgg	tcc	acc	ccc	gaa	gcc	cgc	acc	cta	gcc	atc	1058
	Val	Asp	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	
		255					260					265					
55	cgc	ggg	gtg	gcc	tcc	tac	ttc	gcc	gcc	gcc	gtg	atg	ctg	ccc	tac	aaa	1106
	Arg	Gly	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Met	Leu	Pro	Tyr	Lys	
		270				275					280					285	
60	atc	ttc	cac	tcc	gag	gcc	gaa	aaa	tcc	ggc	tac	gac	atc	gag	tac	cta	1154
	Ile	Phe	His	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ile	Glu	Tyr	Leu	
					290					295					300		
65	ggc	caa	ctc	ttt	ggc	gtg	ggc	tat	gag	aca	acc	gcc	cac	cgc	ttg	tcc	1202
	Gly	Gln	Leu	Phe	Gly	Val	Gly	Tyr	Glu	Thr	Thr	Ala	His	Arg	Leu	Ser	
				305				310						315			
70	acc	ctg	cag	cgc	ccc	aac	ctg	cgc	ggc	atc	ccc	ttt	acc	ttc	gtg	cgc	1250
	Thr	Leu	Gln	Arg	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr	Phe	Val	Arg	
			320					325					330				

gtc gac cgc gcc ggc aac atg tcc aaa cgc caa tcc gcc acc ggc ttc 1298
 Val Asp Arg Ala Gly Asn Met Ser Lys Arg Gln Ser Ala Thr Gly Phe
 335 340 345

5 cac ttc acc cac tac ggc ggc acc tgc ccc ctg tgg aac gtg ttt gaa 1346
 His Phe Thr His Tyr Gly Gly Thr Cys Pro Leu Trp Asn Val Phe Glu
 350 355 360 365

10 acc ttc acc aac ccc ggc caa gtg ctc cgc caa ttc gcg caa atg ccc 1394
 Thr Phe Thr Asn Pro Gly Gln Val Leu Arg Gln Phe Ala Gln Met Pro
 370 375 380

15 gac gga cgc aac tac ctg tgg atc tca cgc acc gtg cga cac cac gaa 1442
 Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Trp Ile Ser Arg Thr Val Arg His His Glu
 385 390 395

20 gcc cgg ttc ggc gaa gta gac aaa atg ttc gcc atc ggc ctg ggc tgc 1490
 Ala Arg Phe Gly Glu Val Asp Lys Met Phe Ala Ile Gly Leu Gly Cys
 400 405 410

gaa gcg cgc cac gcc gac cgc act gtg tac tcc cgc ggt ttc aac ctc 1538
 Glu Ala Arg His Ala Asp Arg Thr Val Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Leu
 415 420 425

25 cag gac ctc tcc acc gcc acc ccc atc ggg tcc ggc tgc cga gtg tgc 1586
 Gln Asp Leu Ser Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ser Gly Cys Arg Val Cys
 430 435 440 445

30 acc cgc gag aac tgc gcg cag cgc gca ttc cca tcc gtc cac ggc cgc 1634
 Thr Arg Glu Asn Cys Ala Gln Arg Ala Phe Pro Ser Val His Gly Arg
 450 455 460

35 atc aac atc gac gcg cac gaa tcc act atc gcg ccg tac taagaaaagg 1683
 Ile Asn Ile Asp Ala His Glu Ser Thr Ile Ala Pro Tyr
 465 470

40 agcttgcttt acgaacgacc ctgcgggggt gggttttacc ttttatgaat gatcagcaat 1743
 atccgcgtaa acaccatcgg tagccagaag aacatcatcc ggggcgataa tcagggacca 1803
 cccgcgtcgc cctgcgctga cgtagattcg ctcttgagaga attgcagact catccaaaaa 1863
 cacgcggtgc ttgtttctt gccctat 1890

45 <210> 2
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2
 Met Gly Lys Thr Tyr Val Gly Ser Arg Leu Arg Gln Leu Arg Arg Glu
 1 5 10 15

55 Arg Asp Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ala Ala Thr Leu Gly Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Tyr Val Asn Gln Ile Glu His Asp Val Arg Pro Leu Thr Val Pro
 35 40 45

Val Leu Leu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Gly Val Asp Ala Thr Phe Phe
 50 55 60
 5 Ser Arg Asp Asp Asp Ser Arg Leu Leu Ala Glu Val Gln Asp Val Met
 65 70 75 80
 Leu Asp Arg Glu Ile Asn Pro Ala Asn Val Glu Leu Gln Glu Leu Ser
 85 90 95
 10 Glu Met Val Tyr Asn His Pro Gln Leu Ala Arg Ala Met Val Glu Met
 100 105 110
 15 His Gln Arg Tyr Arg Asn Val Arg Asp Lys Phe Ser Ile Ala Val Asp
 115 120 125
 Asn Arg Thr Asn Thr Pro Glu Glu Arg Arg Pro Ile Ala Glu Ala Val
 130 135 140
 20 Ser Met Pro His Glu Glu Val Arg Asp Phe Ile Tyr Ala Arg Gln Asn
 145 150 155 160
 Tyr Phe Asp Ala Leu Asp Arg Arg Ala Glu Ala Ile Ala Ala Gln Leu
 165 170 175
 25 Gly Trp Gln Pro Tyr Asp Ser Arg Ala Met Glu Asp Ser Ile Ala Arg
 180 185 190
 30 Arg Leu Gln Met Asp His Asp Val Thr Ile Thr Ser Ser Lys Glu Glu
 195 200 205
 Ser Gly Thr Leu His His Phe Asp Pro Glu Thr Arg Leu Leu Thr Ile
 210 215 220
 35 His Ala Arg Leu Asn Pro Gly Gln Arg Ala Phe Arg Met Ala Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Gly Tyr Leu Glu Ala Asn Asp Leu Ile Glu Gly Ile Val Asp Asp
 245 250 255
 40 Gly Ile Trp Ser Thr Pro Glu Ala Arg Thr Leu Ala Ile Arg Gly Val
 260 265 270
 45 Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Val Met Leu Pro Tyr Lys Ile Phe His
 275 280 285
 Ser Glu Ala Glu Lys Ser Gly Tyr Asp Ile Glu Tyr Leu Gly Gln Leu
 290 295 300
 50 Phe Gly Val Gly Tyr Glu Thr Thr Ala His Arg Leu Ser Thr Leu Gln
 305 310 315 320
 Arg Pro Asn Leu Arg Gly Ile Pro Phe Thr Phe Val Arg Val Asp Arg
 325 330 335
 55 Ala Gly Asn Met Ser Lys Arg Gln Ser Ala Thr Gly Phe His Phe Thr
 340 345 350

His Tyr Gly Gly Thr Cys Pro Leu Trp Asn Val Phe Glu Thr Phe Thr
355 360 365

5 Asn Pro Gly Gln Val Leu Arg Gln Phe Ala Gln Met Pro Asp Gly Arg
370 375 380

10 Asn Tyr Leu Trp Ile Ser Arg Thr Val Arg His His Glu Ala Arg Phe
385 390 395 400

Gly Glu Val Asp Lys Met Phe Ala Ile Gly Leu Gly Cys Glu Ala Arg
405 410 415

15 His Ala Asp Arg Thr Val Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Leu Gln Asp Leu
420 425 430

Ser Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ser Gly Cys Arg Val Cys Thr Arg Glu
435 440 445

20 Asn Cys Ala Gln Arg Ala Phe Pro Ser Val His Gly Arg Ile Asn Ile
450 455 460

25 Asp Ala His Glu Ser Thr Ile Ala Pro Tyr
465 470

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID
No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des
20 Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
10 daß die Hybridisierung unter einer Stringenz
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen
abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
20 daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das mikE17-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere
25 ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das mikE17-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid mikE17 kodiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 14.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
 kodierende Gen *dapA*,
- 14.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
 Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 14.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
30 Gen *tpi*,

- 14.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 14.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 5 14.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 14.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 10 14.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 14.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 14.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 15 14.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 14.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 20 14.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 14.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase
kodierende Gen pgi,
- 5 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
- 10 16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der
beanspruchten Sequenz, trägt.
- 15 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
- 20 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator
Mike17 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der
Sequenz des mike17-Gens aufweisen,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
25 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das mikE17-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.